Литература

1. Miedzobrodzki J., Naidu A.S., Watts J.I., Ciborowski P., Palm K., Wadsröm T. Effect of milk on fibronectin and collagen type I binding to Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis // J. Clin. Microbiol. 1989. V. 27. P. 540-544.

2. Miyauchi H., Kaino A., Shinoda I., Fukuwatari Y., Hayasawa H. Immunomodulatory effect of bovine lactoferrin pepsin hydrolysate on murine splenocytes and Peyer's patch cells // J. Dairy Sci. 1997. V. 80. P. 2330-2339.

3. Holmgren J., Svennerholm A.M., Ahrén C. Nonimmunoglobulin fraction of human milk inhibits bacterial adhesion (hemagglutination) and enterotoxin binding of Escherichia coli and Vibrio cholerae // Infect. Immun. 1981. V. 33. P. 136-141.

4. Dionysius D.A., Milne J.M. Antibacterial peptides of bovine lactoferrin: purification and characterization // J. Dairy. Sci. 1997. V. 80. P. 667-674.

5. Dionysius D.A., Grieve P.A., Milne J.M. Forms of lactoferrin: their antibacterial effect on enterotoxigenic Escherichia coli // J. Dairy Sci. 1993. V. 76. P. 2597-2606.

6. Naidu A.S. Lactoferrin: Natural, Multifunctional, Antimicrobial. - Boca Raton, FL: CRC Press, 2000. 86 p.

7. Zimecki M., Mazurier J., Machnicki M., Wieczorek Z., Montreuil J., Spik G. Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4- CD8- murine thymocytes // Immunol. Lett. 1991. V. 30. P. 119-124.

8. Гринь В.А., Родионова Т.Н., Строгов В.В. Фармакокоррекция селеновой недостаточности у телят на откорме. – Краснодар. – Ветеринария Кубани, № 6, 2011. – с. 25-26.

Контактная информации об авторах для переписки

Исаева Анна Юрьевна соискатель кафедры «Терапия, акушерство и фармакология» ФГБОУ ВПО Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова

Староверов Сергей Александрович доктор биологических наук начальник отдела биохимии и иммунологии ГНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт РАСХН г. Саратов, профессор кафедры «Терапия, акушерство и фармакология» ФГБОУ ВПО Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова

Волков Алексей Анатольевич доктор ветеринарных наук, заведующий кафедрой «Терапия, акушерство и фармакология» ФГБОУ ВПО Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова

Ларионов Сергей Васильевич доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий кафедрой «Паразитологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы», член - корреспондент Российской Академии сельскохозяйственных наук, заслуженный ветеринарный врач РФ

Козлов Сергей Васильевич кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры «Терапия, акушерство и фармакология» ФГБОУ ВПО Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова

УДК 619:636.09:633.88

Исаева А.Ю., Староверов С. А., Волков А. А., Ларионов С. В., Козлов С. В.
(Саратовский ГАУ, Саратовский НИВИ РАСХН, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов)

КОНСТРУИРОВАНИЕ НАНО РАЗМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ НА ОСНОВЕ КОЛЛОИДНОГО СЕЛЕНА

Ключевые слова: коллоидный селен, наночастица, наноноситель, наноплатформа.

Одной из важнейших проблем в фармацевтической отрасли остается адресная доставка лекарственных веществ предназначенная для повышения эффективности лечения. Как известно, традиционные лекарственные формы содержат одно или несколько индивидуальных лекарственных веществ в формах, пригодных для энтерального или парентерального введения. Применяемые подходы к введению лекарств в организм человека и животных, основанные на использовании общепринятых лекарственных форм, имеют целый ряд существенных недостатков:

- повышенный расход лекарственных веществ, вызванный тем, что лекарственное вещество не достигает всех необходимых биологических мишеней или достигает, но в концентрации значительно меньшей по сравнению с необходимой терапевтической;

- ненаправленное действие лекарственного вещества, т.е. взаимодействие с нецелевыми биообъектами, часто приводит к побочным эффектам, обусловленным его метаболитами, и к нецелевому, иррациональному расходу лекарственного средства;

- невозможность поддержания оптимальной терапевтической концентрации лекарственного вещества в течение необходимого времени и, как следствие, необходимость частого приёма лекарственного препарата;

- недостаточная биосовместимость и нежелательные физиологические эффекты в области введения лекарственных средств. Необходимость использования специальных методик введения лекарственного препарата;

- значительные трудности в использовании лекарственных веществ с неоптимальными транспортными свойствами (например, высокая липофильность).

Наиболее ярко перечисленные недостатки проявляются при использовании лекарственных веществ с выраженным побочным действием (большинство противоопухолевых препаратов), а так же лекарств, действующих на центральную нервную систему: наркотические анальгетики, средства лечения болезни Альцгеймера и др., т.е. лекарственных агентов, действие которых требует преодоления гематоэнцефалического барьера.

Цель данного исследования: изучение возможности использования коллоидного селена в качестве наноразмерного средства внутриклеточной доставки биоактивных веществ и антигенов во внутриклеточное пространство.

Материалы и методы исследований. Коллоидный селен синтезировался нами по методу Bo Huang et al (2003).

Использованные в работе культуры клеток почек эмбрионов свиньи (SPEV), получены из криобанка коллекции клеточных культур лаборатории вирусологии научно-исследовательской ветеринарного института Российской академии сельскохозяйственных наук (РАСХН) (Саратов). Культивирование клеточных культур проводили в пластиковых флаконах в полной RPMI среде (10% эмбриональной сыворотки, гентамицин, ампициллин, амфотерицин) при 37 С. Диссоциация клеток монослойной культуры достигалась промыванием монослоя раствором трипсина в течение 10 мин.

При изучении взаимодействия коллоидного селена с клетками к 1 мл клеточной суспензии с количеством клеток 1*108- 109 вносится 0,5 конъюгат селена с лактоферрином с концентрацией белка 1мг на мл перерастворенный в полной среде и 1 мл среды. Ставится на ночь в термостат 370С.

Электронную микроскопию осуществляли на электронном микроскопе LIBRA 120 (Carl Zeiss, Германия). Микроскопию проводили на микроскопе Leica DM 2500 с использованием режимов фазового контраста, темного поля, флуоресценции. Эффект темного поля достигался за счет бокового освещения препарата осветителем Leica CLS. Захват и анализ изображения достигается с помощью цифровой FireWire видеокамеры Leica DFC420C и программы Leica Application Suite.

Результаты и обсуждение. Мы решили использовать селен, как наноразмерное средство внутриклеточной доставки, опираясь на предположение, что данный элемент, имеет определенное преимущество перед другими носителями, связанное с тем, что сам коллоидный селен, является частью метаболической цепочки организма, и вполне вероятно может усваиваться во внутриклеточном пространстве. Тем самым мы убираем нежелательные последствия, связанные с «утилизацией» организмом самого наноносителя.

Проведя синтез полученной нами частицы, мы провели изучение ее размера при помощи электронной микроскопии и установили, что размер частиц полученного нами препарата колеблется в диапазоне от 40 до 100 нм (рисунок 1).

Предварительное изучение созданного нами препарата с биологическими объектами проводили на клетках линии HeLa. Данные по взаимодействию частиц с клетками приведены на рисунках 2; 3.

На всех фотографиях видно оранжевое свечение, что, является включением селена в клетках, и соответственно свидетельствует о проникновении препарата через клеточную мембрану.

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Коллоидный селен представляет собой нано частицы размером от 40 до 100 нм;

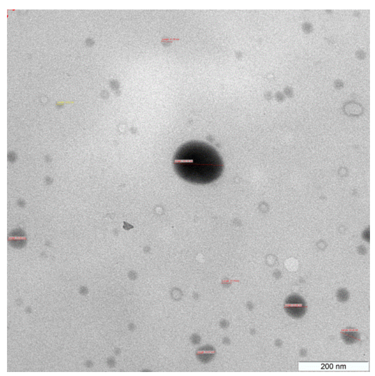


Рисунок 1 - Электронная микроскопия образцов полученного препарата коллоидного селена

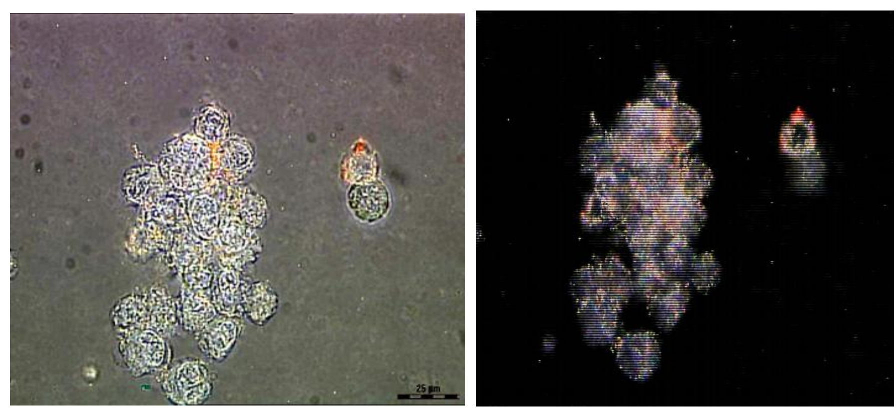


Рисунок 2 - Микроскопия образцов в проходящем и отраженном свете

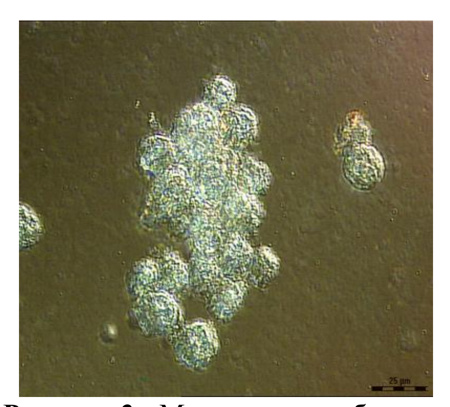


Рисунок 3 - Микроскопия образцов с использованием объективов DIC

2. Коллоидный селен свободно проникает через клеточную мембрану и накапливается во внутриклеточном пространстве;

3. Нано частицы селена могут использоваться в качестве наноразмерного средства внутриклеточной доставки биоактивных веществ и антигенов во внутриклеточное пространство.

Резюме: В работе было выполнено конструирование нано размерной частицы на основе селена и определены ее основные физико-химические показатели.

SUMMARY
The work contains results of construction of the nano-part on the basis of selenium. Its physico-chemical and biological features were estimated and determined as well.

Keywords: colloidal selenium, nano-part, nano-carrier, nano-basis.

Литература

1. Авцин А.П., Жаворонков А.А., Риш М.А., Строчкова Л.С. //Микроэлементозы человека. М., 1991. С. 196-202
2. Мурох В. И., Коломиец Н. Д., Петрова В. С., Гриц М. А., Мойсееиок А. Г. Роль селена в организме животного и человека //Весцi нацыянальнай акадэмii навук беларусi № 3 2002 Серыя бiялапчных навук С. 99-105
3. Jia X., Li N.,Chen J. A subchronic toxicity study of elemental Nano-Se in Sprague-Dawley rats // Life Sci. 2005;76(17):1989-2003
4. Dungeng Peng, Jinsong Zhang, QingliangLiu, Ethan Will Taylor Size effect of elemental selenium nanoparticles (Nano-Se) at supranutritional levels on selenium accumulation and glutathione S-transferase activity // Journal of Inorganic Biochemistry 2007 Volume 101, No 10, P. 1457-1463
5. Bo Huang, Jinsong Zhang, Jingwu Hou, and Chang Chen Free radical scavenging efficiency of nano-Se in vitro //Free Radical Biology & Medicine.-2003.-Vol.-35.-No. 7.-pp.805–813
6. Jinsong Zhang, Xufang Wang and Tongwen Xu Elemental Seleniumat Nano Size (Nano-Se) as a Potential emopreventive Agent with Reduced Risk of Selenium Toxicity: Comparison with Se-Methylselenocysteine in Mice // Toxicllogical Sciences 101(1),22–31(2008)
7. Фримель Г. Иммунологические методы. -М.: Медицина, 1987, -472 с.
8. Bernas T., Dobrucki J.W. The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC // Arch. Biochem. Biophys. 2000. V. 380. P. 108-116
9. Bo Huang, Jinsong Zhang, Jingwu Hou, and Chang Chen Free radical scavenging efficiency of nano-Se in vitro // Free Radical Biology & Medicine.-2003.-Vol.-35.-No. 7.-pp.805–813,
10. Пастер Е.У., Овод В.В., Позур В.К., Вихоть Н.Е. Иммунология: Практикум. - Киев: Вища шк., 1989.
11. Michael V. Berridge, An S. Tan, Kathy D. McCoy, Rui Wang The Biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts // Biochemica.- 1996.-№. 4.-p.14-19
12. Кузакова Н. А., Самойлова Е. О., Моловская Л. Д. Оценка пролиферативной активности лимфоцитов в МТТ-тесте // Инструкция к применению «МинЗдрав Республика Беларусь.-2002.-6 стр.

Контактная информации об авторах для переписки

Исаева Анна Юрьевна соискатель кафедры «Терапия, акушерство и фармакология» ФГБОУ ВПО Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова

Староверов Сергей Александрович доктор биологических наук начальник отдела биохимии и иммунологии ГНУ Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт РАСХН г. Саратов, профессор кафедры «Терапия, акушерство и фармакология» ФГБОУ ВПО Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова

Волков Алексей Анатольевич доктор ветеринарных наук, заведующий кафедрой «Терапия, акушерство и фармакология» ФГБОУ ВПО Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова

Ларионов Сергей Васильевич доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий кафедрой «Паразитологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы», член - корреспондент Российской Академии сельскохозяйственных наук, заслуженный ветеринарный врач РФ

Козлов Сергей Васильевич кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры «Терапия, акушерство и фармакология» ФГБОУ ВПО Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова